

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-105680

(43)Date of publication of application : 19.04.1994

(51)Int.Cl.

C12N 5/02
C12M 3/02
C12M 3/06
C12N 5/06

(21)Application number : 04-259844

(71)Applicant : SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 29.09.1992

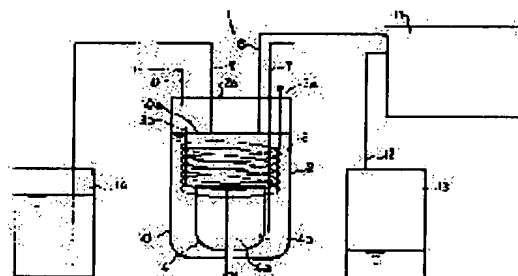
(72)Inventor : KONDO TETSUYA
HOZUMI TATSUNOBU
OTSUKA HIROSHI
ISHIKAWA HIRONORI
NOGUCHI HIROSHI

(54) CULTURE METHOD FOR ANIMAL CELL AND DEVICE THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To accomplish mass culture of animal cells in high density without damaging or destroying the cells by agitation under specified conditions using an agitator in a culture tank.

CONSTITUTION: The revolving shaft 4a of an agitator 4 to suspend animal cells into a medium 10 is equipped with plural agitating blades 4b..., and the radius of gyration of each of the agitating blades is set at 1/4 to 3/8 times the inner diameter of a culture tank 2 and the number of revolutions at 5 to 30r.p.m. The cells are fed with oxygen through an aerating tube 3, the cells are separated from the medium using a centrifugal separator 11, and a fresh medium is fed from a medium reservoir 14 into the culture tank.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

【物件名】

甲第二号証

【添付書類】



(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-105680

(43) 公開日 平成6年(1994)4月19日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/02		9281-4B		
C 1 2 M 3/02				
3/06				
C 1 2 N 5/08		9281-4B	C 1 2 N 5/ 00	E
審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 13 頁)				

(21) 出願番号 特願平4-259844

(22) 出願日 平成4年(1992)9月29日

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 近藤 哲也

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(72) 発明者 柿岡 施信

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(72) 発明者 大塚 浩史

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 原 謙三

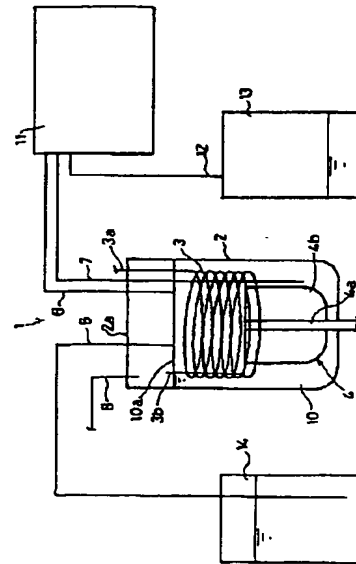
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物細胞の培養方法および培養装置

(57) 【要約】

【構成】 培養装置1は、培養槽2、細胞を培地10中に懸濁させるための攪拌装置4、細胞に酸素を供給する通気チューブ3、培地10と細胞とを分離する遠心分離機11、および培養槽2に新しい培地を供給する培地貯液槽14を備えている。攪拌装置4は、回転軸4aに複数の攪拌翼4b…を有し、これら攪拌翼4b…は、回転半径が培養槽2内径の1/4以上、3/8以下となるような大きさに形成され、5r.p.m.以上、30r.p.m.以下の回転数で回転される。

【効果】 細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となる。



(2)

特開平6-105680

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】培養槽に満たされた細胞培養液中で培養する動物細胞の培養方法であって、回転半径が上記の培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段で上記の細胞培養液を攪拌することを特徴とする動物細胞の培養方法。

【請求項2】回転速度を攪拌翼の外周部分で $800\text{ cm}/\text{分}$ 以下とすることを特徴とする請求項1記載の動物細胞の培養方法。

【請求項3】細胞培養液中に少なくとも多孔性チューブを有する酸素供給手段でチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給すると共に、分離手段で細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還し、かつ、培養液供給手段で培養槽に新しい細胞培養液を供給することを特徴とする請求項1または請求項2記載の動物細胞の培養方法。

【請求項4】培養槽に満たされた細胞培養液中で培養する動物細胞の培養装置であって、回転半径が上記の培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段を備え、この攪拌手段により上記の細胞培養液を攪拌することを特徴とする動物細胞の培養装置。

【請求項5】回転速度が攪拌翼の外周部分で $800\text{ cm}/\text{分}$ 以下であることを特徴とする請求項4記載の動物細胞の培養装置。

【請求項6】少なくとも多孔性チューブを有し、細胞培養液中にチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給する酸素供給手段と、細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還する分離手段と、培養槽に新しい細胞培養液を供給する培養液供給手段とを備えていることを特徴とする請求項4または請求項5記載の動物細胞の培養装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、連続培養法により、例えば、抗体産生細胞等の動物細胞を培養すると共に、この動物細胞に例えばモノクローナル抗体等の目的物を生産させる動物細胞の培養方法および培養装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、例えば、インターフェロン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、モノクローナル抗体等の生物製剤を製造するための製造手段として、工業的規模での動物細胞の大量培養方法の確立が極めて重要と

なっている。

【0003】動物細胞（以下、単に「細胞」と称する）の培養は、培養フラスコやスピナーフラスコ等の培養容器を用いた実験室的規模で行われているが、このような小規模の培養方法を工業的規模に単純にスケールアップしたのでは、細胞の呼吸ガス交換や攪拌効率等に不都合を生じ、細胞を大量培養することができない。そこで、従来、微生物を用いた大量培養方法を参考にした細胞の大量培養方法が種々検討されている。

【0004】ところが、細胞は微生物と比較して、以下の点で異なる。即ち、細胞は微生物と比較して、①機械的強度が弱い、②増殖を行うために多種の栄養素および増殖因子を必要とし、③増殖速度が極めて遅い（倍加時間微生物：0.2～数時間、細胞：1～数日間）。このため、微生物の大量培養に用いられるジャーファーマンター（攪拌式培養装置）等を用いて細胞を大量培養した場合、細胞が機械的損傷等を受けて十分に生育することができず、また、培養容器内の栄養分を消費した時点で増殖が停止するために細胞密度を高くすることができない。従って、微生物の大量培養方法を用いて細胞を大量培養した場合には、目的物の生産効率が非常に悪いという問題を有している。

【0005】そこで、これらの問題を解消するために、高密度灌流培養法と称される連続培養法が考案されている。高密度灌流培養法とは、目的物および老廃物を含んだ細胞培養液（以下、培地と称する）の上清（上澄み）を培養槽外へ抜き取ると共に、栄養素を含んだ新しい培地を培養槽へ供給することにより、培養槽を細胞の生育および目的物の生産に最適な条件に保ち、細胞を大量かつ高密度に培養して目的物を生産する方法である。

【0006】上記従来の高密度灌流培養法としては、例えば、極微小の細孔を有する中空糸カートリッジに細胞を封入し、上記の中空糸を介して栄養物等を交換することで細胞を増殖させて目的物を生産する方法（特開昭62-171669号公報）、セラミック等からなる担体の表面に細胞を固定し、上記の担体表面にて栄養物等を交換することで細胞を増殖させて目的物を生産する方法（オブチセル（チャールスリバー、米国））等の固定化培養法と、例えば、前記のジャーファーマンターと、細胞と培地とを分離する分離装置とを組み合わせることにより、細胞を高密度に増殖させて目的物を生産する方法（特開昭62-134086号公報）等の懸濁培養法とが提案されているが、細胞のサンプリングや目的物の品質管理、あるいは装置の大型化が容易なことから、懸濁培養法が有望視されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、懸濁培養法において、培養槽を細胞の生育および目的物の生産に最適な条件に保つには、細胞に対する物理的刺激（培

3

地の攪拌による剪断力や発泡等)の除去が重要な課題となっている。

【0008】培地の攪拌は、例えば、回転半径が培養槽内径の $1/4$ 以下となるような大きさに形成された攪拌翼を30r.p.m.以上の回転数で回転して行われているため、培地に乱流が発生して細胞に剪断力等の物理的刺激を与えて、細胞に損傷や破壊等の悪影響を及ぼすという問題を有している。

【0009】このように、上記従来の懸濁培養法においては、細胞に対する物理的刺激(培地の攪拌による剪断力や発泡等)の除去が不十分となっている。従って、細胞の大量培養を行うには到っていない。

【0010】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

【0011】即ち、請求項1記載の発明の動物細胞の培養方法は、上記の課題を解決するために、培養槽に満たされた細胞培養液中で培養する動物細胞の培養方法であって、回転半径が上記の培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段で上記の細胞培養液を攪拌することを特徴としている。

【0012】請求項2記載の発明の動物細胞の培養方法は、上記の課題を解決するために、請求項1記載の動物細胞の培養方法において、回転速度を攪拌翼の外周部分で800cm/分以下とすることを特徴としている。

【0013】請求項3記載の発明の動物細胞の培養方法は、上記の課題を解決するために、請求項1または請求項2記載の動物細胞の培養方法において、細胞培養液中に少なくとも多孔性チューブを有する酸素供給手段でチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給すると共に、分離手段で細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還し、かつ、培養液供給手段で培養槽に新しい細胞培養液を供給することを特徴としている。

【0014】請求項4記載の発明の動物細胞の培養装置は、上記の課題を解決するために、培養槽に満たされた細胞培養液中で培養する動物細胞の培養装置であって、回転半径が上記の培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段を備え、この攪拌手段により上記の細胞培養液を攪拌することを特徴としている。

【0015】請求項5記載の発明の動物細胞の培養装置は、上記の課題を解決するために、請求項4記載の動物細胞の培養装置において、回転速度が攪拌翼の外周部分で800cm/分以下であることを特徴としている。

(3)

特開平6-105680

4

【0016】請求項6記載の発明の動物細胞の培養装置は、上記の課題を解決するために、請求項4または請求項5記載の動物細胞の培養装置において、少なくとも多孔性チューブを有し、細胞培養液中にチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給する酸素供給手段と、細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還する分離手段と、培養槽に新しい細胞培養液を供給する培養液供給手段とを備えていることを特徴としている。

【0017】上記の培養方法としては、例えば浮遊培養法等が挙げられ、この浮遊培養法としては、例えばバッチ培養法、セッドバッチ培養法(半回分培養法、流加培養法)、連続培養法等が挙げられ、上記の連続培養法としては、例えば高密度灌流培養法等が挙げられる。

【0018】また、上記の培養方法として連続培養法を行う場合、細胞と培地との分離方法には、①沈降管もしくは沈降槽を用いて重力により沈降させて分離する、②フィルターを用いて分離する、③遠心分離により分離する等の方法がある。また、動物細胞としてヒト抗体産生細胞を用いる場合、細胞培養液としては蛋白濃度が5mg/l以下、細胞培養液中の溶存酸素濃度が0.1ppm以上、3ppm以下、グルコース濃度が0.1g/l以上、乳酸濃度が5g/l以下の範囲にそれぞれ調整された無血清培養液が挙げられる。

【0019】上記の培養装置における攪拌翼の回転半径としては培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の範囲が挙げられる。また、攪拌翼1枚の面積としては培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上の大きさが挙げられ、具体的には、 $1/15$ 以上、 $1/4$ 以下の大きさが挙げられる。攪拌翼の枚数としては2枚以上の枚数が挙げられ、具体的には、2枚以上、4枚以下の枚数が挙げられる。

【0020】また、上記の培養装置における攪拌翼は、細胞培養液が上下方向に対流し易いように、回転軸に対して $0^\circ \sim 15^\circ$ 、望ましくは $5^\circ \sim 15^\circ$ 程度の傾斜角度をなしていてもよく、また、攪拌翼は、細胞培養液が遠心方向に流れ易いように、回転軸からの垂直線に対して外周部分が内側よりも後方に位置するよう偏心していてもよい。さらに、攪拌翼の縦方向の長さとしては回転直径の $1 \sim 1/4$ 程度の長さが挙げられる。その上、攪拌翼の回転速度としては攪拌翼の外周部分で800cm/分以下の速度が挙げられ、具体的には、300cm/分 \sim 800cm/分の速度が挙げられる。

【0021】

【作用】請求項1記載の方法においては、動物細胞の細胞培養液を、回転半径が上記の培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段で攪拌するので、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激に

50

5

より損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となる。

【0022】請求項2記載の方法においては、回転速度を攪拌翼の外周部分で800cm/分以下とするので、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内でより大量かつ高密度に培養することが可能となる。

【0023】請求項3記載の方法においては、細胞培養液中に少なくとも多孔性チューブを有する酸素供給手段でチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給すると共に、分離手段で細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還し、かつ、培養液供給手段で培養槽に新しい細胞培養液を供給するので、培養槽内を動物細胞にとって最適の条件に保つことができると共に、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となる。

【0024】請求項4記載の構成においては、回転半径が上記の培養槽内径の1/4以上、3/8以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の1/15以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段を備え、この攪拌手段により上記の細胞培養液を攪拌するので、動物細胞に、攪拌による剪断力等の物理的刺激による損傷や破壊等の悪影響を与えずに、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となる。

【0025】請求項5記載の構成においては、回転速度が攪拌翼の外周部分で800cm/分以下であるので、動物細胞に、攪拌による剪断力等の物理的刺激による損傷や破壊等の悪影響を与えずに、培養槽内でより大量かつ高密度に培養することが可能となる。

【0026】請求項6記載の構成においては、少なくとも多孔性チューブを有し、細胞培養液中にチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給する酸素供給手段と、細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還する分離手段と、培養槽に新しい細胞培養液を供給する培養液供給手段とを備えているので、培養槽内を動物細胞にとって最適の条件に保つことができると共に、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となる。

【0027】
【実施例】本発明の培養装置の一実施例について図1ないし図4に基づいて説明すれば、以下の通りである。

【0028】図1に示すように、本実施例にかかる培養装置1は、培養槽2内部に、通気チューブ（酸素供給手段）3と攪拌装置（攪拌手段）4とが配されており、また、培地注入管（培養液供給手段）5、培地抜き取り管

(4)

特開平6-105680

6

（分離手段）6、細胞返却管（分離手段）7、および排気管8が配されて構成されている。上記の培養装置1は、加熱滅菌が行える程度の耐熱性を有している。

【0029】培養槽2は、例えば、硬質ガラスやステンレス等で作製されており、内部には細胞培養液（以下、培地と称する）10が満たされている。培養槽2には蓋2aが設けられており、この蓋2aには、通気チューブ3、培地注入管5、培地抜き取り管6、細胞返却管7、および排気管8を挿入するための穴が設けられている。また、培養槽2には、液面センサ、DO電極（溶存酸素濃度測定器）、およびpH電極（何れも図示せず）が各々所定の位置に取り付けられている。さらに、培養槽2は、水槽やジャケット（図示せず）等で外側が覆われており、水槽やジャケット内の水温を調節することで培養槽2内の培地10の温度制御を行うことができるようになっている。

【0030】培地10は、培養される動物細胞（図示しない、以下、単に「細胞」と称する）により適宜成分が選択されるが、例えば、RPMI-1640培地、ダルベコ変法イーグル培地およびハムF-12培地を2:1:1の割合で混合したRDF-1TES培地（村上ら、Agric. Biol. Chem., 46(7), 1831-1937, 1982）を基礎培地とし、この基礎培地に微量成分を添加することにより改変した無血清培地が用いられる。この無血清培地は、培地中の蛋白濃度が5mg/l以下に調整されているので、培地から目的物を分離する際に蛋白成分による悪影響が低減され、目的物を精製し易いようになっている。また、高価な蛋白の使用量が少ないため、上記の無血清培地は安価となり、連続培養を行う上で経済的となっている。

【0031】培地10中で培養される細胞は、生産する目的物により最適のものが選択されるが、例えば、目的物がヒトモノクローナル抗体である場合には、ヒト由来B細胞、マウスハイブリドーマ、ヒト・マウスハイブリドーマ、抗体遺伝子をミエロマ細胞に導入した組み換え細胞等のリンパ系細胞（ヒト抗体産生細胞）が用いられる。培養槽2内の培地10に導入された細胞は、目的物の生産に必要な細胞密度に達するまで増殖させた後、目的物を生産させるようになっている。

【0032】通気チューブ3は、培地10や細胞は通過できないが、酸素や二酸化炭素は通過できる大きさの無数の孔が開いた、例えば、多孔性フッ素樹脂チューブ、多孔性ポリプロピレンチューブ、多孔性シリコンチューブ等の多孔性チューブで作製されており、螺旋状に形成されて培養槽2内の培地10に浸漬されている。通気チューブ3の長さは、通気チューブ3の内外径、培養する細胞の種類、培養条件等により最適の長さが決定されるが、例えば、外径3~10mm、内径2~9mm、空隙率50%、最大孔径2μmの多孔性フッ素樹脂チューブ（例えば、ポアフロン：住友電工株式会社製、大

7

版)であれば、培地11当たり0.3m以上、好ましくは1m以上の長さがあればよい。また、通気チューブ3内には、空気または酸素を50~1000ml/mi n. の速度で通気すればよく、この場合の酸素移動容量係数(kLa)は、約2~51/hrである。

【0033】通気チューブ3の先端部3aは、培養槽2の蓋2aに設けられた穴に挿入されることにより培養槽2外部に引き出される一方、通気チューブ3の末端部3bは、培地10の液面10aの上方で開放されている。また、通気チューブ3の先端部3aは、空気を送気する送風機や酸素ポンプ(何れも図示せず)等に接続されており、これにより、通気チューブ3内に空気または酸素が通気されている。よって、通気チューブ3表面で、培地10中の二酸化炭素と通気チューブ3内の酸素とをチューブ通気によりガス交換することができると共に、培地10の液面10aで上面通気も行えるようになっている。通気チューブ3の末端部3bから放出された空気または酸素は、培養槽2の蓋2aの穴に挿入された排気管8により、培養槽2外部に放出される。従って、通気チューブ3により、細胞の呼吸による培地10中の酸素消費を補って細胞の増殖を促し、目的物を生産させることができる。

【0034】また、細胞の培養開始時は培地10中の細胞密度が低く、酸素の消費量が小さいため、酸素の供給量も小さくてよい。従って、通気チューブ3内に空気を通気して溶存酸素濃度を2~6ppmに保つようにすればよい。そして、対数増殖期になると細胞密度が高くなり、酸素の消費量が大きいため、酸素の供給量も大きくする必要がある。従って、通気チューブ3内に酸素を通気して溶存酸素濃度を0.1~3ppmに制御すればよい。

【0035】さらに、通気チューブ3の先端部3aは、二酸化炭素ポンプ(図示せず)にも接続されており、通気チューブ3内に二酸化炭素を通気することにより、培地10のpH調整を行うことができるようになっている。尚、通気チューブ3の末端部3bを培地10の液面10aの上方で開放せずに培養槽2の蓋2aに設けられた穴に挿入することにより培養槽2外部に引き出し、代わりに、蓋2aに図示しない通気管を取り付けて通気チューブ3とは別に空気または酸素を供給して培地10の液面10aで上面通気を行わせる構成にしてもよい。

【0036】攪拌装置4は、例えば、ステンレスやフッ素樹脂等で作製されており、回転軸4aが培養槽2底面の中心に設けられた穴に挿入されることにより培養槽2外部に引き出されて、図示しない攪拌モータに接続されている。上記の回転軸4aの先端部には、少なくとも2枚の攪拌翼4b…が取り付けられている。攪拌翼4bの形状は特に限定されないが、図2に示すように、例えば、攪拌翼4bの形状を平板状に形成した場合には、細胞に損傷を与えることなく、後述の回転数で細胞を培地

(5)

特開平6-105680

8

10中に懸濁させるために、攪拌翼4bの翼長A(即ち、攪拌翼4bの回転半径)が培養槽2の内径Cの1/4以上、3/8以下となるような長さに形成すればよい。

【0037】また、攪拌翼4bの高さBは、攪拌翼4bの面積(A×B)が、培養槽2を縦方向に切った場合における培地10の縦方向断面面積の1/15以上、好ましくは、1/15以上、1/4以下となるような高さに形成すればよく、具体的には、培養槽2に満たされる培地10の液深にもよるが、高さBが翼長Aに対して略1/2~2倍となるような高さに形成すればよい。上記の攪拌翼4b…は、回転軸4aに対して、0~15°、好ましくは、5~15°程度の傾斜角度をなして取り付けられており、培地10が上下方向に対流し易いようになっている。尚、攪拌翼4b…は、培地10が遠心方向に流れ易いように、回転軸4aからの垂直線に対して、外周部分が内側より後方に位置するように偏心させて取り付けてもよい。また、回転軸4aは、培養槽2底面に対して垂直方向に設ける以外に、培地10が上下方向に対流し易いように、回転軸4aを培養槽2底面に対して垂直方向から20°以下の角度をなして設けてもよい。

【0038】上記の攪拌翼4b…は、細胞に損傷を与えることなく、細胞を培地10中に懸濁させるために、攪拌翼4b…の外周部分の回転速度が800cm/min.以下、好ましくは、300cm/min.以上、800cm/min.以下となるような速度で攪拌するようになっている。具体的には、攪拌翼4b…は、培地10を5r.p.m.以上、30r.p.m.以下、好ましくは、10r.p.m.以上、20r.p.m.以下の回転数で攪拌するようになっている。ここで、仮に、攪拌翼4bの翼長Aが培養槽2の内径Cの1/4未満となるような長さに形成すると、攪拌翼4b…を30r.p.m.の回転数で回転させても細胞を培地10中に懸濁させることができないので好ましくなく、また、攪拌翼4bの翼長Aが培養槽2の内径Cの3/8よりも大きくなるような長さに形成すると、攪拌翼4b翼端と培養槽2内壁との間で培地10に乱流が生じて細胞に損傷を与えるので好ましくない。従って、上記のように攪拌翼4bの翼長Aを設定し、かつ、攪拌翼4b…の回転数を制御することで、細胞に損傷を与えることなく、細胞を培地10中に懸濁させることができるようになっている。

【0039】尚、攪拌装置4の回転軸4aは、培養槽2底面に設けられた穴に挿入されることで培養槽2外部に引き出される代わりに、培養槽2の蓋2aに設けられた穴に挿入されることで培養槽2外部に引き出されてもよい。この場合は、培養槽2底面に穴を設ける必要がないので、培養槽2の構造を簡略化することができる。

【0040】図1に示すように、上記の培地抜き取り管6および細胞返却管7は、例えば、ステンレスやフッ素樹脂等で作製されており、培養槽2の蓋2aに設けられ

50

(6)

特開平6-105680

9

10

た穴に挿入されることにより培養槽2外部に引き出されている。そして、これら管6・7は、図示しないポンプ等を介して遠心分離機(分離手段)11に接続されており、培地10中に懸濁している細胞と、細胞によって生産された目的物とを分離した後、培地交換を行うと共に目的物を回収するようになっている。即ち、培地10の上清(上澄み)を培地抜き取り管6で抜き出して、遠心分離機11で細胞と目的物とを遠心分離し、細胞を含んだ培地を細胞返却管7で培養槽2の底部近傍に戻すと共に、目的物を含んだ培地を送液管12で目的物貯液槽(分離手段)13に送ることにより、培地交換を行うと同時に目的物を回収している。尚、目的物貯液槽13に貯えられた培地に含まれる目的物は、所定の方法により単離、精製される。

【0041】上記の遠心分離機11は、細胞に損傷を与えることなく、細胞と目的物とを分離するために、培地10の上清を300×g以下、好ましくは、100×g以下の遠心加速度で遠心分離するようになっている。尚、培地10の上清の抜き出しは、連続的に行ってもよく、間歇的に行ってもよい。例えば、培養が定常状態となり、培地10の上清の抜き出しを連続的に行う場合には、培養槽2の容量や培養する細胞の種類等にもよるが、遠心分離機11は1~20l/hの液量を無菌状態で処理できる能力を有していればよい(例えば、セントリテックCC100:セントリテック・エー・ビー、ノースボルグ製、スウェーデン)。

【0042】上記の培地注入管5は、新しい培地が入っている培地貯液槽(培養液供給手段)14に接続されており、培養槽2の蓋2aに設けられた穴から培養槽2内に挿入されている。そして、培地注入管5は、目的物貯液槽13に送られる目的物を含んだ培地と同量の新しい培地を、培養槽2に供給するようになっている。尚、新しい培地の供給は、連続的に行ってもよく、間歇的に行ってもよい。但し、培養が定常状態になれば連続的に行うことが望ましい。

【0043】上記の液面センサ(図示せず)は、培養槽2内における培地10の液面10aの位置を検知して、この結果を、図示しない制御装置に入力する。同様に、pH電極(図示せず)は、培地10のpHを測定し、ま

た、DO電極(図示せず)は、培地10中の溶存酸素濃度を測定して、各々結果を制御装置に入力する。これにより、制御装置は、培地注入管5から供給される新しい培地量や培地抜き取り管6から抜き出される培地量を調節し、あるいは通気チューブ3内に通気する酸素や二酸化炭素の量を調節して、培地10中の溶存酸素濃度を0.1ppm以上、3ppm以下に、グルコース濃度を0.1g/l以上に、乳酸濃度を5g/l以下にそれぞれ制御し、常に、培養槽2内の培地10を細胞の増殖や目的物の生産を行う最適の培養環境に保つようになっている。

【0044】例えば、培地10中の溶存酸素濃度が0.1ppm未満となると細胞が酸欠状態となるので好ましくなく、一方、溶存酸素濃度が3ppmより多くなると細胞が酸素過多により損傷を受ける虞れが生じるので好ましくない。また、グルコース濃度が0.1g/l未満となると細胞が十分に増殖しないので好ましくなく、一方、乳酸濃度が5g/lより多くなると細胞に対する毒性が大きくなり、細胞の活性が低下して生存率が低下するので好ましくない。尚、培地10の交換率(灌流比)は、培養する細胞の種類や細胞密度等にもよるが、培養槽2内の培地量に対し、0.5~5回/日程度とすればよい。

【0045】次に、本発明の培養方法の一実施例として、上記構成の培養装置1を用いて細胞の連続培養を行い、培地10中の細胞密度、および細胞により生産された目的物の培地10中での濃度を、以下に示す条件で数日間測定した結果を示す。

【0046】上記の条件は、1)培地10として、RDF-ITES培地を改変した無血清低蛋白培地である、表1に示すような成分組成のS-RDF-ITES培地を用いた。表1中におけるヒトトランスフェリン(2.0mg/l)およびウシインシュリン(2.0mg/l)が蛋白成分であり、よって、S-RDF-ITES培地の蛋白濃度は4.0mg/lに調整されている。また、グルコース濃度は5.0g/lに調整されている。

【0047】

【表1】

(7)

特開平6-105680

成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)
パラアミノ安息香酸	5.52	パラアミノ安息香酸	5.52
塩酸ピリドキシン	0.021	塩酸ピリドキシン	0.021
リボフラビン	1.06	リボフラビン	1.06
塩酸チアミン	1.03	塩酸チアミン	1.03
シアノコバラミン	0.05	シアノコバラミン	0.05
リボ酸	0.02	リボ酸	0.02
リノール酸	6500	リノール酸	6500
塩化ナトリウム	356	塩化ナトリウム	356
塩化カリウム	48	塩化カリウム	48
塩化マグネシウム (無水)	14	塩化マグネシウム (無水)	14
塩化マグネシウム (無水)	58	塩化マグネシウム (無水)	58
塩化カルシウム (無水)	34	塩化カルシウム (無水)	34
硫酸カルシウム (無水)	0.006	硫酸カルシウム (無水)	0.006
硫酸亜鉛 (七水塩)	0.22	硫酸亜鉛 (七水塩)	0.22
リン酸一水素ナトリウム (無水)	35	リン酸一水素ナトリウム (無水)	35
リン酸二水素ナトリウム (無水)	36	リン酸二水素ナトリウム (無水)	36
硫酸第二鉄 (七水塩)	0.025	硫酸第二鉄 (七水塩)	0.025
硫酸第一鉄 (七水塩)	0.21	硫酸第一鉄 (七水塩)	0.21
グルコース	4000	グルコース	4000
コハク酸ナトリウム (六水塩)	88	コハク酸ナトリウム (六水塩)	88
コハク酸	55	コハク酸	55
ヒルビン酸ナトリウム	49	ヒルビン酸ナトリウム	49
フェノールレッド	5.0	フェノールレッド	5.0
ヒトランスフェリン	4.2	ヒトランスフェリン	4.2
ウシインシュリン	2.0	ウシインシュリン	2.0
亜セレン酸ナトリウム	0.004	亜セレン酸ナトリウム	0.004
エタノールアミン	1.5	エタノールアミン	1.5
2-メルカプトエタノール	0.017	2-メルカプトエタノール	0.017
クエン酸ナトリウム	2.7	クエン酸ナトリウム	2.7
塩化第二鉄 (六水塩)	2.7	塩化第二鉄 (六水塩)	2.7

成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)
レアルギニン塩酸塩	193	レアルギニン塩酸塩	193
レアラニン	22	レアラニン	22
レオスバリン (一水塩)	22	レオスバリン (一水塩)	22
レオスバリン (一水塩)	38	レオスバリン (一水塩)	38
レオスバリン (一水塩)	7	レオスバリン (一水塩)	7
レオスバリン (一水塩)	5	レオスバリン (一水塩)	5
レオスバリン (一水塩)	33	レオスバリン (一水塩)	33
グリシン	14	グリシン	14
ヒスチジン塩酸塩 (一水塩)	25	ヒスチジン塩酸塩 (一水塩)	25
ヒドロキシプロリン	10	ヒドロキシプロリン	10
ロイシン	52	ロイシン	52
ロイシン	54	ロイシン	54
リジン塩酸塩	65	リジン塩酸塩	65
メチオニン	16	メチオニン	16
フェニルアラニン	25	フェニルアラニン	25
プロリン	18	プロリン	18
セリン	28	セリン	28
スレオニン	36	スレオニン	36
トリプトファン	7	トリプトファン	7
チロシン	29	チロシン	29
バリン	36	バリン	36
グルタミン	0	グルタミン	0
グルタミン	0	グルタミン	0
グルタミン	1	グルタミン	1
グルタミン	2	グルタミン	2
グルタミン	3	グルタミン	3
グルタミン	5	グルタミン	5
グルタミン	1	グルタミン	1
グルタミン	2	グルタミン	2
グルタミン	8	グルタミン	8
グルタミン	1	グルタミン	1
グルタミン	1	グルタミン	1
グルタミン	18	グルタミン	18
グルタミン	0	グルタミン	0
グルタミン	4	グルタミン	4
グルタミン	1	グルタミン	1

【0048】また、2) 培養装置1の培養槽2として、内径250mm、高さ480mm、容量20lの平底ジャーファーマンター (F22000:アルファラバル製、スウェーデン) を用いた。平底ジャーファーマンター内の培地の温度制御は、ジャーファーマンター外側を覆っているジャケット内の管に通した水の温度を調節することにより行った。3) 攪拌翼4bとして、平板状に形成した、翼長Aが80mm、高さBが160mmの4枚翼を用い、回転軸4aに対して、5°の傾斜角度をなして取り付け、5~15r.p.m.の回転数で回転させた。4) 通気チューブ3として、外径7mmの多孔性フ

ッ素樹脂チューブ (パイオット製、東京) 5mを螺旋状に巻いて、平底ジャーファーマンター内に納めた。5) 上記の平底ジャーファーマンターに、液面センサー (グライツセンサー: 藤原製作所製、東京)、pH電極 (465-50-S7: インゴルト製、スイス)、およびDO電極 (φ25mm-70: インゴルト製、スイス) を取り付けした。

【0049】さらに、6) 細胞の培養は、培養装置1で本培養を行う前に、培養フラスコ、11丸底フラスコ、および61丸底フラスコを用いて前培養を行った。即ち、培養装置1で本培養を行う細胞は、培養フラスコ

13

11および61丸底フラスコを用い、所定の細胞密度で接種した後、パッチ培養することにより増殖させた。以下、前培養に用いた上記3種類のフラスコについて説明する。

【0050】培養フラスコ（図示せず）として、容量150mlの静置式組織培養フラスコ（T-フラスコ：コーニング製、米国）を用いた。

【0051】図3に示すように、11丸底フラスコとして、内径100mm、高さ200mmのガラス製スピナーフラスコ（柴田ハリオガラス製、東京）22を用いた。このスピナーフラスコ22における攪拌装置24の攪拌翼24b…として、平板状に形成した翼長A₁が40mm、高さB₁が20mmの2枚翼を用いた。通気方法は、フラスコ内のガスを置換する上面通気を行った。また、スピナーフラスコ22に、図示しないpH電極（405-DPAS-K8S/325：インゴルト製、スイス）を取り付けた。さらに、スピナーフラスコ22内の培地の温度制御は、スピナーフラスコ22外側を覆っている水槽（図示せず）の水温を調節することにより行った。

【0052】図4に示すように、61丸底フラスコとして、内径190mm、高さ250mmのガラス製丸底ジャーファーマンター（柴田ハリオガラス製、東京）32を用いた。この丸底ジャーファーマンター32における攪拌装置34の攪拌翼34b…として、平板状に形成した翼長A₂が40mm、高さB₂が80mmの4枚翼を用い、回転軸34aに対して、5°の傾斜角度をなして取り付けた。チューブ通気を行う通気チューブ33として、外径7mmの多孔性フッ素樹脂チューブ（バイオット製、東京）3mを螺旋状に巻いて、丸底ジャーファーマンター32内に納めた。また、上記の丸底ジャーファーマンター32に、pH電極（405-DPAS-K8S/325：インゴルト製、スイス）39a、およびDO電極（φ14mm：丸菱バイオエンジニアリング製、東京）39bを取り付けた。さらに、丸底ジャーファーマンター32内の培地の温度制御は、ジャーファーマンター32外側を覆っている水槽（図示せず）の水温を調節することにより行った。尚、攪拌装置34の攪拌速度やpH等の培養環境は、図示しない制御装置（MCT-3S：丸菱バイオエンジニアリング製、東京）を用いて制御した。

【0053】そして、上記の1）～6）の条件下で、細胞を所定の細胞密度で平底ジャーファーマンター（培養槽2）内のS-RDF-ITES培地（培地10）中に懸濁し、本培養を開始した。また、細胞の増殖に伴い、遠心分離機11を用いた培地交換または連続灌流を行い培養を継続した。結果を実施例1～3として以下に示す。但し、本発明の培養方法は、実施例1～3に限定されるものではない。

【0054】【実施例1】細胞として、マウスミエローマP3X63Ag8.653とヒトリンパ球との細胞融

(8)

特開平6-105680

14

合により得られたヒトIg（免疫グロブリン）M産生ヒト・マウスハイブリドーマ細胞株を用いた。

【0055】まず、細胞を、T-フラスコ内の培地70mlに、細胞密度 1.0×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、二酸化炭素濃度5%の雰囲気下、37℃で静置すると、培養開始後3日目に、細胞密度 7.4×10^5 個/mlに増殖した。また、培養終了時での抗体（目的物、ヒトIgM）濃度は28mg/lであった。

【0056】次に、T-フラスコ内で増殖した細胞を、スピナーフラスコ22内の培地500mlに、細胞密度 1.0×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、37℃、pH6.8～7.1、30r.p.m.の回転数で攪拌すると、培養開始後3日目に、細胞密度 6.6×10^5 個/mlに増殖した。また、培養終了時での抗体濃度は25mg/lであった。

【0057】さらに、スピナーフラスコ22内で増殖した細胞を、丸底ジャーファーマンター32内の培地5lに、細胞密度 1.0×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、37℃、pH6.8～7.1、13r.p.m.の回転数で攪拌すると、培養開始後3日目に、細胞密度 7.9×10^5 個/mlに増殖した。また、培養終了時での抗体濃度は30mg/lであった。

【0058】上記のようにして前培養した細胞を、平底ジャーファーマンター内の培地15lに、細胞密度 1.8×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、37℃、pH6.8～7.1、10r.p.m.の回転数で攪拌して本培養した。また、多孔性フッ素樹脂チューブ内の通気速度を200～500ml/min.とし、本培養開始時はチューブ内に空気を通気して溶存酸素濃度を2～6ppmに保ち、細胞が増殖するに従い、空気中の酸素分圧を増加させて溶存酸素濃度を0.5～3ppmに制御した。すると、本培養開始後3日目に、細胞密度 6.8×10^5 個/mlに増殖した。この時点で4時間灌流を行い、培地を交換し、さらに、本培養開始後4日目以降は連続的に灌流を行った。尚、培地の交換率（灌流比）は、平底ジャーファーマンター内の培地液量（15l）に対し、1～1.3回/日とした。また、本培養期間中、培地中のグルコース濃度を1g/l以上、乳酸濃度を2.7g/l以下にそれぞれ制御した。

【0059】上記のようにして細胞を15日間、本培養すると、表2に示すような細胞密度に増殖し、本培養開始後13日目に、細胞密度 7.7×10^6 個/mlとなった。また、細胞が増殖するに伴い、表2に示すように抗体濃度も増加し、本培養開始後12日目に、抗体濃度は105mg/lとなった。

【0060】

【表2】

50

15

培養日数 (日)	細胞密度 (個/ml)	抗体濃度 (mg/l)
1	1.8×10^5	—
3	6.8×10^5	—
4	7.4×10^5	3
5	1.4×10^6	8
6	2.0×10^6	30
7	2.3×10^6	41
8	3.1×10^6	52
9	3.7×10^6	62
10	5.1×10^6	75
11	5.9×10^6	89
12	6.8×10^6	105
13	7.7×10^6	76
14	7.5×10^6	82
15	7.5×10^6	72

【0061】以上の結果から、上記構成の培養装置1および培養方法は、細胞の増殖や目的物の生産性向上を促すことがわかる。即ち、上記構成の培養装置1および培養方法により、細胞に損傷等を与えずに増殖させることが可能であると共に、細胞を培養槽内で大量かつ高密度に培養して、目的物である抗体を安定して効率的に大量生産することが可能であることがわかる。

【0062】【実施例2】細胞として、マウスミエローマP3X63Ag8.653とマウスリンパ球との細胞融合により得られたマウスIgG産生マウスハイブリドーマ細胞株を用いた。

【0063】まず、細胞を、T-フラスコ内の培地70mlに、細胞密度 1.1×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、二酸化炭素濃度5%の雰囲気下、37℃で静置すると、培養開始後4日目に、細胞密度 1.5×10^6 個/mlに増殖した。細胞の倍加時間は28.1時間であった。

【0064】次に、T-フラスコ内で増殖した細胞を、スピナーフラスコ22内の培地500mlに、細胞密度 2.7×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、37℃、pH6.8~7.1、20r.p.m.の回転数で攪拌すると、培養開始後3日目に、細胞密度 8.2×10^6 個/mlに増殖した。細胞の倍加時間は44.6時間であった。

【0065】さらに、スピナーフラスコ22内で増殖した細胞を、丸底ジャーファーマンター32内の培地5lに、細胞密度 3.1×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、37℃、pH6.8~7.1、12r.p.m.の回転数で攪拌すると、培養開始後2日目に、細胞密度 1.05×10^6 個/mlに増殖した。細胞の倍加時間は27.0時間であった。

【0066】上記のようにして前培養した細胞を、平底ジャーファーマンター内の培地14.5lに、細胞密度 2.9×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、37℃、pH6.8~7.1、10r.p.m.の回転数で攪

(9)

特開平6-105680

16

拌して本培養した。また、多孔性フッ素樹脂チューブ内の通気速度を200~500ml/minとし、本培養開始時はチューブ内に空気を通気して溶存酸素濃度を2~6ppmに保ち、細胞が増殖するに従い、空気中の酸素分圧を増加させて溶存酸素濃度を0.5~3ppmに制御した。すると、本培養開始後4日目に、細胞密度 1.08×10^6 個/mlに増殖した。この時点で3時間灌流を行い、培地を交換した。また、本培養開始後5日目に、細胞密度 1.33×10^6 個/mlに増殖した。この時点で3時間灌流を行い、培地を交換し、さらに、本培養開始後6日目以降は連続的に灌流を行った。尚、培地の交換率(灌流比)は、平底ジャーファーマンター内の培地液量(14.5l)に対し、1.5~2.0回/日とした。また、本培養期間中、培地中のグルコース濃度を1.5g/l以上、乳酸濃度を2.3g/l以下にそれぞれ制御した。

【0067】上記のようにして細胞を18日間、本培養すると、表3に示すような細胞密度に増殖し、本培養開始後18日目に、細胞密度 3.4×10^6 個/mlとなった。

【0068】

【表3】

培養日数 (日)	細胞密度 (個/ml)
1	2.9×10^5
4	1.1×10^6
5	1.3×10^6
6	1.5×10^6
7	1.5×10^6
8	1.8×10^6
9	1.7×10^6
10	1.8×10^6
11	1.7×10^6
12	1.8×10^6
13	2.0×10^6
14	2.2×10^6
15	2.3×10^6
16	2.7×10^6
17	2.7×10^6
18	3.4×10^6

【0069】以上の結果から、上記構成の培養装置1および培養方法は、細胞の増殖を促すことがわかる。即ち、上記構成の培養装置1および培養方法により、細胞に損傷等を与えずに増殖させることが可能であると共に、細胞を培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能であることがわかる。

【0070】【実施例3】細胞として、ナマルバ細胞を宿主とするヒトIgM産生組み換え細胞を用いた。

【0071】まず、細胞を、T-フラスコ内の培地70mlに、細胞密度 2.0×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、二酸化炭素濃度5%の雰囲気下、37

(10)

特開平6-105680

17

で静置すると、培養開始後4日目に、細胞密度 9.4×10^4 個/mlに増殖した。細胞の倍加時間は43.7時間であった。また、培養終了時での抗体(目的物、ヒトIgM)濃度は 5.8 mg/l であった。

【0072】次に、T-フラスコ内で増殖した細胞を、スピナーフラスコ22内の培地500mlに、細胞密度 2.1×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、 37°C 、 $\text{pH}6.8 \sim 7.1$ 、 15 r.p.m. の回転数で攪拌すると、培養開始後4日目に、細胞密度 1.27×10^6 個/mlに増殖した。細胞の倍加時間は33.8時間であった。また、培養終了時での抗体濃度は 3 mg/l であった。

【0073】さらに、スピナーフラスコ22内で増殖した細胞を、丸底ジャーフェンター32内の培地5lに、細胞密度 2.6×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、 37°C 、 $\text{pH}6.8 \sim 7.1$ 、 15 r.p.m. の回転数で攪拌すると、培養開始後5日目に、細胞密度 7.9×10^5 個/mlに増殖した。細胞の倍加時間は71.6時間であった。また、培養終了時での抗体濃度は 3.9 mg/l であった。

【0074】上記のようにして前培養した細胞を、平底ジャーフェンター内の培地15lに、細胞密度 2.3×10^5 個/mlとなるように接種して懸濁し、 37°C 、 $\text{pH}6.8 \sim 7.1$ 、 10 r.p.m. の回転数で攪拌して本培養した。また、多孔性フッ素樹脂チューブ内の通気速度を $200 \sim 500 \text{ ml/min.}$ とし、本培養開始時はチューブ内に空気を通気して溶存酸素濃度を $2 \sim 6 \text{ ppm}$ に保ち、細胞が増殖するに従い、空気中の酸素分圧を増加させて溶存酸素濃度を $0.5 \sim 3 \text{ ppm}$ に制御した。すると、本培養開始後3日目に、細胞密度 9.2×10^5 個/mlに増殖した。この時点で3時間灌流を行い、培地を交換した。本培養開始後5日目に、細胞密度 1.7×10^6 個/mlに増殖した。この時点で3時間灌流を行い、培地を交換した。本培養開始後6日目に、細胞密度 2.7×10^6 個/mlに増殖した。この時点で3時間灌流を行い、培地を交換した。本培養開始後7日目に、細胞密度 4.1×10^6 個/mlに増殖した。この時点で3時間灌流を行い、培地を交換し、さらに、本培養開始後8日目以降は連続的に灌流を行った。尚、培地の交換率(灌流比)は、平底ジャーフェンター内の培地液量(15.8l)に対し、 $1.5 \sim 5$ 回/日とした。また、本培養期間中、培地中のグルコース濃度を 1.5 g/l 以上、乳酸濃度を 2.5 g/l 以下にそれぞれ制御した。

【0075】上記のようにして細胞を21日間、本培養すると、表4に示すような細胞密度に増殖し、本培養開始後20日目に、細胞密度 1.8×10^7 個/mlとなった。また、細胞が増殖するに伴い、表4に示すように抗体濃度も増加し、本培養開始後11日目以降の抗体濃度は、 $10 \sim 19 \text{ mg/l}$ と安定した。

【0076】

【表4】

培養日数 (日)	細胞密度 (個/ml)	抗体濃度 (mg/l)
1	2.3×10^5	—
3	9.2×10^5	4
4	9.6×10^5	—
5	1.7×10^6	13
6	2.7×10^6	—
7	4.1×10^6	15
8	4.7×10^6	—
9	7.0×10^6	—
10	8.4×10^6	—
11	9.6×10^6	14
12	1.2×10^7	15
13	1.4×10^7	17
14	1.5×10^7	19
15	1.6×10^7	12
16	1.6×10^7	12
17	1.6×10^7	15
18	1.7×10^7	10
19	1.7×10^7	17
20	1.8×10^7	11
21	1.8×10^7	14

【0077】以上の結果から、上記構成の培養装置1および培養方法は、細胞の増殖や目的物の生産性向上を促すことがわかる。即ち、上記構成の培養装置1および培養方法により、細胞に損傷等を与えずに増殖させることが可能であると共に、細胞を培養槽内で大量かつ高密度に培養して、目的物である抗体を安定して効率的に大量生産することが可能であることがわかる。

【0078】尚、上記の実施例1～3は、本発明の培養方法および培養装置を用いた細胞培養の一例を示すものであり、培養槽2等の寸法、前培養の方法および装置、培地10の成分組成、細胞の種類、培地の温度やpH等を始めとする培養環境等は、勿論、上記の実施例1～3に示した数値や種類等に限定されるものではなく、必要に応じて適宜変更が可能である。また、細胞の培養日数(期間)は、勿論、上記の実施例1～3に示した日数で終了もしくは打ち切られるものではなく、本発明の培養方法および培養装置を用いて、細胞を数ヶ月あるいは数年に渡って連続培養することが可能である。

【0079】

【発明の効果】請求項1記載の発明の動物細胞の培養方法は、以上のように、回転半径が上記の培養槽内径の $1/4$ 以上、 $3/8$ 以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の縦方向断面積の $1/15$ 以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段で上記の細胞培養液を攪拌する方法である。

【0080】これにより、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが

(11)

特開平6-105680

19

可能となるという効果を奏する。

【0081】請求項2記載の発明の動物細胞の培養方法は、以上のように、請求項1記載の動物細胞の培養方法において、回転速度を攪拌翼の外周部分で800cm/分以下とする方法である。

【0082】これにより、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内でより大量かつ高密度に培養することが可能となるという効果を奏する。

【0083】請求項3記載の発明の動物細胞の培養方法は、以上のように、請求項1または請求項2記載の動物細胞の培養方法において、細胞培養液中に少なくとも多孔性チューブを有する酸素供給手段でチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給すると共に、分離手段で細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還し、かつ、培養液供給手段で培養槽に新しい細胞培養液を供給する方法である。

【0084】これにより、培養槽内を動物細胞にとって最適の条件に保つことができると共に、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となるという効果を奏する。

【0085】請求項4記載の発明の動物細胞の培養装置は、以上のように、回転半径が上記の培養槽内径の1/4以上、3/8以下の、攪拌翼1枚の面積が上記の培養槽の細胞培養液部の横方向断面積の1/15以上となるような大きさに形成された攪拌翼を有する攪拌手段を備え、この攪拌手段により上記の細胞培養液を攪拌する構成である。

【0086】これにより、動物細胞に、攪拌による剪断力等の物理的刺激による損傷や破壊等の悪影響を与えずに、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となるという効果を奏する。

【0087】請求項5記載の発明の動物細胞の培養装置は、以上のように、請求項4記載の動物細胞の培養装置において、回転速度が攪拌翼の外周部分で800cm/分以下である構成である。

【0088】これにより、動物細胞に、攪拌による剪断力等の物理的刺激による損傷や破壊等の悪影響を与えずに、培養槽内でより大量かつ高密度に培養することが可

20

能となるという効果を奏する。

【0089】請求項6記載の発明の動物細胞の培養装置は、以上のように、請求項4または請求項5記載の動物細胞の培養装置において、少なくとも多孔性チューブを有し、細胞培養液中にチューブ通気を行って動物細胞に酸素を供給する酸素供給手段と、細胞培養液と動物細胞とを遠心分離し、細胞培養液を培養槽外に抜き取る一方、動物細胞を培養槽に返還する分離手段と、培養槽に新しい細胞培養液を供給する培養液供給手段とを備えている構成である。

【0090】これにより、培養槽内を動物細胞にとって最適の条件に保つことができると共に、動物細胞が攪拌による剪断力等の物理的刺激により損傷や破壊等の悪影響を受けることはなく、培養槽内で大量かつ高密度に培養することが可能となるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例における培養装置の構成を示すブロック図である。

【図2】上記培養装置における攪拌翼の大きさを示す説明図である。

【図3】前培養に用いるスピナーフラスコの説明図である。

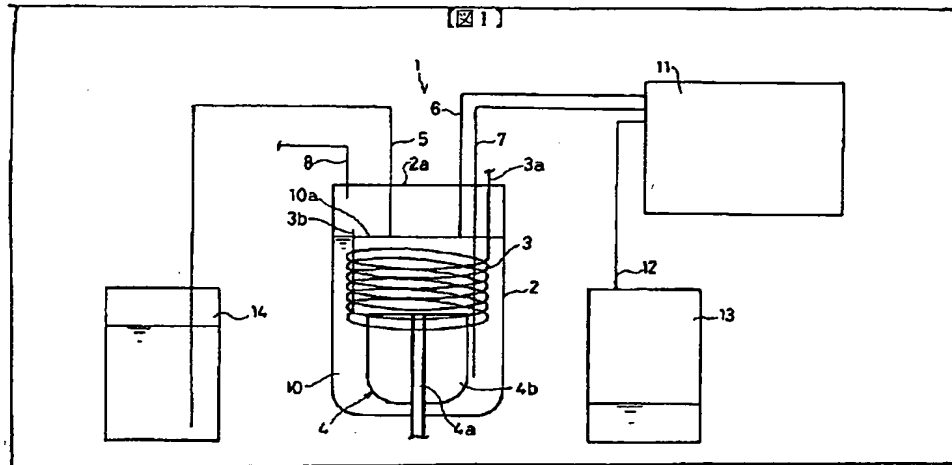
【図4】前培養に用いる丸底ジャーファーメンターの説明図である。

【符号の説明】

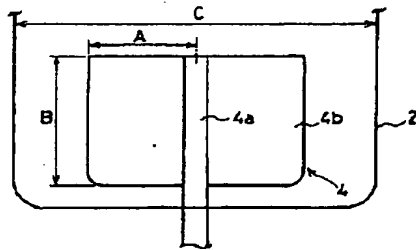
- 1 培養装置
- 2 培養槽
- 3 通気チューブ（酸素供給手段）
- 4 攪拌装置（攪拌手段）
- 4b 攪拌翼
- 5 培地注入管（培養液供給手段）
- 6 培地抜き取り管（分離手段）
- 7 細胞返却管（分離手段）
- 10 培地（細胞培養液）
- 11 遠心分離機（分離手段）
- 13 目的物貯液槽（分離手段）
- 14 培地貯液槽（培養液供給手段）
- A 翼長（即ち、回転半径）
- B 高さ
- C 内径

(12)

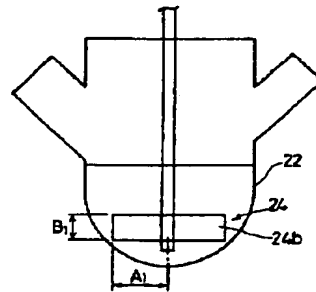
特開平 6-105680



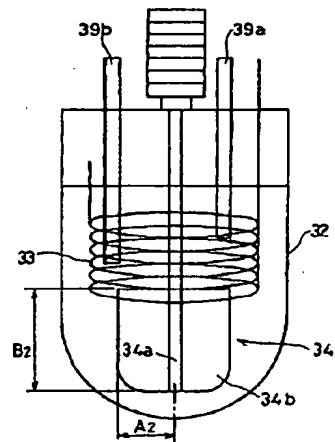
【図2】



【図3】



【図4】



(13)

特開平 6 - 1 0 5 6 8 0

フロントページの続き

(72)発明者 石川 弘典
兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化
学工業株式会社内

(72)発明者 野口 浩
兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化
学工業株式会社内